

**Use of glucuronan oligo- or polysaccharides, especially produced by Rhizobium meliloti, as cytokine production stimulants for preparing immunostimulant agents****Publication number:** FR2781673**Publication date:** 2000-02-04**Inventor:** COURTOIS SAMBOURG JOSIANE; COURTOIS BERNARD**Applicant:** UNIV PICARDIE (FR)**Classification:****- international:** A61K31/715; A61P29/00; C12P19/04; A61K31/715; A61P29/00; C12P19/00; (IPC1-7): A61K31/715; A61K31/19; A61P29/00**- european:** A61K31/715; C12P19/04**Application number:** FR19980009647 19980728**Priority number(s):** FR19980009647 19980728**[Report a data error here](#)****Abstract of FR2781673**

A glucuronan oligosaccharide or polysaccharide (I) with a molecular weight of 5-700 kD is used as a cytokine production stimulant for preparing an immunostimulant agent. A glucuronan oligosaccharide (Mw: 5000-100000) or polysaccharide (Mw: 100000-700000) (I) selected from beta (1-4) D-polyglucuronic acids of formula (Ia) and their esters and ethers, is used as a cytokine production stimulant for preparing an immunostimulant agent. n = number such that the molecular weight is 5-700 kD. An Independent claim is also included for the production of a beta (1-4) D-polyglucuronic acid oligosaccharide with a molecular weight of 5-60 kD, comprising: (1) culturing *Rhizobium meliloti* (NCIMB 40472) (synonym *Sinorhizobium meliloti*) to produce an extracellular beta (1-4) D-polyglucuronic acid polysaccharide with a molecular weight of 100-700 kD; (2) subjecting the polysaccharide to enzymatic hydrolysis in the culture medium using NCIMB 40472 as a source of glucuronan lyase; and (3) isolating the resulting oligosaccharide.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 781 673

(21) N° d'enregistrement national :

98 09647

(51) Int Cl<sup>7</sup> : A 61 K 31/715, A 61 K 31/19, A 61 P 29/00

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 28.07.98.

(39) Priorité :

(43) Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 04.02.00 Bulletin 00/05.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du  
présent fascicule

(60) Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

(71) Demandeur(s) : UNIVERSITE DE PICARDIE JULES  
VERNE Etablissement public à caractère scientifique et  
culturel — FR.

(72) Inventeur(s) : COURTOIS SAMBOURG JOSIANE et  
COURTOIS BERNARD.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : CABINET FEDIT LORIOT.

(54) UTILISATION D'UN GLUCURONANE EN TANT QU'AGENT IMMUNOSTIMULANT, PROCEDE DE  
PREPARATION.

(57) La présente invention concerne l'utilisation de glucuronanes à enchaînement B (1-4) et ayant un poids moléculaire moyen en poids compris entre 5000 et 700000 Da, en tant qu'agents immunostimulants. Elle concerne également le procédé de préparation de glucuronanes à enchaînement B (1-4) et ayant un poids moléculaire moyen en poids compris entre 5000 et 60000 Da.

- (b) les esters correspondants,
- (c) les éthers correspondants, et
- (d) leurs mélanges.

5 Selon le procédé de ladite publication WO-A-93/18174 précitée, on prépare un polysaccharide (PS) du type glucuronane de formule I partiellement acétylé suivant une technique comprenant :

- (i) la fermentation d'une souche de *Rhizobium meliloti* (autre nomenclature : *Sinorhizobium meliloti*) NCIMB 40472 sur un milieu nutritif,
- 10 (ii) la filtration du milieu de fermentation pour écarter les cellules de ladite souche et recueillir le filtrat,
- (iii) l'isolation d'un glucuronane de poids moléculaire moyen en poids élevé (PS ;  $700000 \geq Mw \geq 100000$ ) par précipitation dudit filtrat au moyen (a) d'un alcool (notamment EtOH ou iPrOH) ou d'une cétone (notamment MeCOMe) ou (b) en milieu acide aqueux (pH 3), puis
- 15 (iv) le cas échéant, l'hydrolyse en milieu acide ou par voie enzymatique dudit PS pour obtenir un oligosaccharide (OS ;  $100000 > Mw \geq 5000$ ).

20 De l'article de G. de RUITER et al., *Carbohydrate Polymers*, 1992, 18, pages 1-7, on sait que des OS du type acide D-polyglucuronique à enchaînement  $\beta(1-4)$  et ayant un Mw compris entre 5500 et 10000 ont été obtenus à partir de moisissures appartenant à l'ordre des mucorales.

25 On sait que les liposaccharides (LPS) peuvent stimuler dans les monocytes la production de cytokines. D'une manière générale, les PS et OS différents des LPS n'agissent pas en tant qu'agents immunostimulants.

30 Cependant, de façon ponctuelle, on sait de l'article de M. OTTERLEI et al., *J. Immunother.*, 1991, 10 (No. 4), pages 286-291 que des alginates stimulent la production de TNF- $\alpha$  (facteur  $\alpha$  de nécrose tumorale), Il-1 (interleukine-1) et Il-6 (interleukine-6) par les monocytes, que des D-polyglucoses à enchaînement  $\beta(1-3)$  et aminés stimulent la production de Il-1 par les macrophages humains, et que des arabino-galactanes stimulent la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les macrophages. Parmi les alginates, qui sont des PS ou OS constitués de séquences homopolymères d'acide mannuronique (M), de séquences homopolymères d'acide guluronique (G) et de séquences alternées d'acide mannuronique et

(c) les éthers correspondants, et  
(d) leurs mélanges,  
en tant que substance stimulant la production d'une cytokine, et destiné à  
la préparation d'un agent biologiquement ou thérapeutiquement immuno-  
stimulant, ledit glucuronane étant un oligosaccharide (OS ;  $100000 > Mw \geq 5000$ ) ou un polysaccharide (PS ;  $700000 \geq Mw \geq 100000$ ).

Selon l'invention l'on recommande également un procédé de  
préparation d'un OS du type D-polyglucuronique à enchaînement  $\beta(1-4)$  et  
ayant un Mw de 5000 à 60000 Da, ledit procédé, qui comprend :

10 (1°) la fermentation d'une souche de *Rhizobium meliloti* (autre  
nomenclature : *Sinorhizobium meliloti*) NCIMB 40472 produi-  
sant exocellulairement un glucuronane qui est un PS du type D-  
polyglucuronique à enchaînement  $\beta(1-4)$  et ayant un Mw tel que  
 $700000 \geq Mw \geq 100000$ ,

15 (2°) l'hydrolyse enzymatique dudit PS pour obtenir un glucuronane  
qui est un OS du type D-polyglucuronique à enchaînement  
 $\beta(1-4)$  et ayant un Mw de 5000 à 60000 Da, et  
(3°) l'isolation dudit OS,

étant caractérisé en ce que l'hydrolyse enzymatique de l'étape (2°) est  
20 effectuée dans le milieu de fermentation de l'étape (1°) en présence des  
bactéries de la souche NCIMB 40472 intervenant en tant que source de  
glucuronane lyase.

#### *Abréviations*

Par commodité, les abréviations et acronymes suivants ont été  
25 utilisés dans le texte de la présente invention.

Ac	acétyle
ANA	alginat de <i>A. nodosum</i> contenant 46 % en poids d'unité acide $\alpha$ -L-guluronique (produit testé dans M. OTTERLEI et al.)
Bu	n-butyle
dp	degré de polymérisation
Et	éthyle
EtO	éthyoxy
GL-1	glucuronane de formule I selon l'invention, où les fonctions alcool OH sont partiellement O-acétylées et qui a un Mw de 35 200000 Da

l'atome d'hydrogène d'au moins un groupe alcool OH est remplacé par un reste acyle aliphatique en C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>,

- les esters des acides polyglucuroniques de formule I dans lesquels (i) le reste OH d'au moins un groupe acide carboxylique COOH est remplacé par un reste alkoxy en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, et (ii) l'atome d'hydrogène d'au moins un groupe alcool OH est remplacé par un reste acyle aliphatique en C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>,
- 5 - les éthers des acides polyglucuroniques de formule I dans lesquels l'atome d'hydrogène d'au moins un groupe alcool OH est remplacé par un reste alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>,
- les éther-esters des acides polyglucuroniques de formule I dans lesquels (i) le reste OH d'au moins un groupe acide carboxylique COOH est remplacé par un reste alkoxy en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, et (ii) l'atome d'hydrogène d'au moins un groupe alcool OH est remplacé par un reste alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, et
- 10 - leur mélanges.

Les groupes alkoxy précités en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> peuvent être à chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée, ils comprennent les groupes MeO, EtO, PrO, iPrO, BuO, iBuO, sBuO et tBuO.

Les groupes alkyle précités en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> peuvent être à chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée, ils comprennent les groupes Me, Et, Pr, iPr, Bu, iBu, sBu et tBu.

Les groupes acyle aliphatiques en C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> peuvent être à chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée, ils comprennent les groupes Ac, COEt, COPr, COiPr.

25 Le glucuronane préféré selon l'invention a un Mw de 100000 à 500000 Da (et mieux 200000 à 350000 Da) et est choisi parmi l'ensemble constitué par

- les acides polyglucuroniques de formule I, et
- leurs esters dans lesquels les fonctions alcool OH sont partiellement 30 O-acétylées, chaque cycle acide glucuronique de la formule I comportant statistiquement jusqu'à 33 % en poids de groupes O-CO-CH<sub>3</sub>, (i.e. OAc) par rapport au poids du cycle unitaire acide glucuronique.

Dans ce dernier cas, la fonction acétyloxy est localisée soit en position 2, soit en position 3, soit encore en positions 2 et 3 du cycle acide glucuronique.

**TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-6.**

Le procédé de préparation des OS selon l'invention comprend l'utilisation d'un ou plusieurs enzymes fournis par la souche NCIMB 40472 elle-même, le ou lesdits enzymes étant ou agissant en tant que 5 glucuronane lyase. Ledit procédé comporte la conservation de ladite souche et la fragilisation de sa paroi pour profiter de la libération de ladite glucuronane lyase ou du produit enzymatique d'activité glucuronane lyasique lors de l'hydrolyse enzymatique.

En pratique l'hydrolyse enzymatique est effectuée par incubation 10 à pH 7, pendant 40 à 60 h, de préférence pendant 48 h, et à une température de 25-35°C, de préférence à 30°C.

Selon un premier mode de réalisation, l'hydrolyse enzymatique comprend (i) l'acidification du milieu de fermentation jusqu'à pH 3, (ii) la neutralisation, au plus tard 0,30 h après l'acidification, du milieu résultant 15 avec une base, de préférence un hydroxyde de métal alcalin tel que NaOH ou KOH à une concentration de 1M à 3M, puis (iii) l'incubation en régulant le pH à 7 par addition de ladite base à une concentration de 1M.

Selon un second mode de réalisation l'hydrolyse enzymatique comprend (i) l'addition de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> au milieu de fermentation, puis (ii) 20 l'incubation en régulant le pH à 7 par addition d'une base, de préférence un hydroxyde de métal alcalin tel que NaOH ou KOH à une concentration de 1M.

Le matériau de départ est le milieu de fermentation obtenu selon la préparation II de ladite publication WO-A-93/18174 précitée. Le 25 procédé de l'invention offre l'avantage d'éviter l'isolation du PS, d'une part, et de fournir de meilleurs rendements en OS, d'autre part.

L'isolation des OS obtenus selon le procédé de la présente invention est réalisée selon une méthode connue en soi, en particulier l'une de celles décrites dans ladite publication WO-A-93/18174 précitée.

30 D'autres avantages et caractéristiques de l'invention seront mieux compris à la lecture qui va suivre d'exemples de réalisation et de résultats d'essais d'immunostimulation. Bien entendu l'ensemble de ces éléments n'est nullement limitatif mais est donné à titre d'illustration.

**Exemple 1**

35 On part du milieu de fermentation obtenu à l'issue de la

5000 et 20000 Da). Une durée d'incubation prolongée (i.e. supérieure à 60 h) conduit à une augmentation du rendement en molécules de masse faible.

***Exemple 4 - Essais -***

5 Des essais de production de cytokines ont été mis en œuvre sur gel selon les modalités opératoires décrites dans l'article de M. OTTERLEI et al. précité, les cellules productrices étant des monocytes de sang humain. La production de cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-6) à partir de monocytes a été testée en présence de glucuronane selon l'invention, à 10 savoir GL-1 (Mw de 200000 Da) et GL-2 (Mw de 350000 Da). Les résultats obtenus, comparés à la production des mêmes cytokines à partir de monocytes en présence d'alginate (ANA) ou de LPS connus pour avoir un effet sur la production desdites cytokines, mettent en évidence que :

10 • GL-1 et GL-2 ont une activité supérieure à LPS et ANA, dans la production de IL-6 et TNF- $\alpha$ , et

15 • GL-1 et GL-2 ont une activité comparable à ANA, dans la production de IL-1.

4. Utilisation suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ledit glucuronane est un PS ayant un Mw compris entre 100000 et 500000 Da et mieux entre 200000 et 350000 Da.

5. Utilisation suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ledit glucuronane est un acide D-polyglucuronique à enchaînement  $\beta(1-4)$  selon la formule I où les groupes de la fonction alcool OH sont partiellement acétylés.

10 6. Utilisation suivant la revendication 5, caractérisée en ce que, dans ledit glucuronane de formule I, les atomes d'hydrogène des fonctions alcool OH sont partiellement remplacés par des groupes acétyle, ledit glucuronane comportant statistiquement jusqu'à 33 % en poids de groupe OAc par rapport au poids du cycle unitaire acide glucuronique.

15 7. Procédé de préparation d'un OS du type D-polyglucuronique à enchaînement  $\beta(1-4)$  et ayant un Mw de 5000 à 60000 Da, ledit procédé, qui comprend :

20 (1°) la fermentation d'une souche de *Rhizobium meliloti* (autre nomenclature : *Sinorhizobium meliloti*) NCIMB 40472 produisant exocellulairement un glucuronane qui est un PS du type D-polyglucuronique à enchaînement  $\beta(1-4)$  et ayant un Mw tel que  $700000 \geq Mw \geq 100000$ ,

25 (2°) l'hydrolyse enzymatique dudit PS pour obtenir un glucuronane qui est un OS du type D-polyglucuronique à enchaînement  $\beta(1-4)$  et ayant un Mw de 5000 à 60000 Da, et

(3°) l'isolation dudit OS,

30 étant caractérisé en ce que l'hydrolyse enzymatique de l'étape (2°) est effectuée dans le milieu de fermentation de l'étape (1°) en présence des bactéries de la souche NCIMB 40472 intervenant en tant que source de glucuronane lyase.

35 8. Procédé suivant la revendication 7, caractérisé en ce que l'hydrolyse enzymatique est effectuée par incubation à pH 7, pendant 40 à 60 h, de préférence pendant 48 h, et à une température de 25-35°C, de préférence à 30°C.

9. Procédé suivant la revendication 8, caractérisée en ce que l'hydrolyse enzymatique comprend (i) l'acidification du milieu de fermentation jusqu'à pH 3, (ii) la neutralisation, au plus tard 0,30 h après

2781673

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREN° d'enregistrement  
nationalFA 562879  
FR 9809647établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	<p>ESPEVIK, TERJE (1) ET AL: "The involvement of CD14 in stimulation of cytokine production by uronic acid polymers."</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1993) VOL. 23, NO. 1, PP. 255-261. ISSN: 0014-2980., XP002098274</p> <p>* page 255, colonne 1, alinéa 1 - colonne 2, alinéa 2 *</p> <p>* page 256, colonne 1, alinéa 1; figure 1; tableau 1 *</p> <p>* page 257, colonne 1, alinéa 2 - page 258, colonne 1, alinéa 1 *</p> <p>* page 260, colonne 1, alinéa 2 *</p> <p>---</p>	1-4
X	<p>MICHAUD, P. ET AL: "Physicochemical properties of extracellular (1.fwdarw. 4)-.beta.-D-glucuronan produced by the Rhizobium meliloti M5N1CS strain during fermentation: evidence of degradation by an exoenzyme activated by Mg<sup>2+</sup>"</p> <p>INT. J. BIOL. MACROMOL. (1994), 16(6), 301-5 CODEN: IJBMDR; ISSN: 0141-8130, XP002098275</p> <p>* page 301, colonne 1, alinéa 1 - page 302, colonne 1, alinéa 5 *</p> <p>---</p>	7,8
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6) A61K
1	<p>Date d'achèvement de la recherche</p> <p>15 avril 1999</p>	Examinateur A. Jakobs
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p>		

2781673

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

N° d'enregistrement  
nationalFA 562879  
FR 9809647établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	BERTOCCHI C ET AL: "SYNTHESIS AND CHARACTERISATION OF POLYGLUCURONAN" CARBOHYDRATE POLYMERS, vol. 27, no. 4, 1 janvier 1995, pages 295-297, XP000539408 * page 295, colonne 1, alinéa 1; figure 1; tableau 2 *	1-4
X	COURTOIS J ET AL: "EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION BY THE RHIZOBIUM MELILOTI M5N1 CS STRAIN. LOCATION AND QUANTITATION OF THE SITES OF O-ACETYLATION" CARBOHYDRATE POLYMERS, vol. 25, no. 1, 1994, pages 7-12, XP000474721 * page 7, colonne 2, alinéa 2 - page 8, colonne 1, alinéa 3; figure 1 * * page 8, colonne 2, alinéa 6 - page 9, colonne 1, alinéa 1 *	7,8
X	EP 0 506 326 A (PROTAN BIOPOLYMER AS ;NOBIPOLE NOBIPOL FORSKNINGSSTI (NO)) 30 septembre 1992 * page 5, ligne 1-5 * * page 7, ligne 15-20; figures 1,5; tableaux 1,2 *	1-4
X	WO 93 18174 A (UNIV PICARDIE) 16 septembre 1993 * page 19, ligne 4 - page 21, ligne 18 *	7,8,10
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
1	Date d'achèvement de la recherche 15 avril 1999	Examinateur A. Jakobs

FORM 1503.03.02 (PO4C19)

## CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul  
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie  
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général  
O : divulgation non écrite

T : théorie ou principe à la base de l'invention  
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.  
D : cité dans la demande  
L : cité pour d'autres raisons

A : membre de la même famille document correspondant